

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 538号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	薛 暁 東		
論文題目	Generation and characterization of the Tbx10 mutant mice (Tbx10 遺伝子変異マウスの作製とその解析)		

博士(医学) 薛 暁 東

## 論文題目

Generation and characterization of the Tbx10 mutant mice

(Tbx10 遺伝子変異マウスの作製とその解析)

## 論文内容の要旨

### [はじめに]

転写因子 T-box 遺伝子ファミリーは発生において重要な役割を果たすとともに、ヒト遺伝病の原因遺伝子となっているものがいくつかある。例えば、上肢の異常と心臓奇形を合併する Holt-Oram 症候群は TBX5 遺伝子の突然変異でおこる。また、心臓大動脈異常、副甲状腺異常、胸腺異常、口蓋裂、特異的顔貌を示す DiGeorge 症候群は TBX1 遺伝子の突然変異または欠失で起こる。

私は、新規 T-box 遺伝子の単離を意図して、Tbx1 の T-box ドメインをプローブとしてマウスゲノムライブラリーをスクリーニングしたところ、遺伝子 Tbx10 を得た。Tbx10 を異所性に発現したトランスジェニックマウスが口蓋裂を呈することが報告されていた(PNAS 101: 7022-7027, 2004)が、ノックアウトマウスは作製されていなかったなので、ノックアウトマウスを作製し、そのマウスを解析した。

### [材料ならびに方法]

#### 1. Tbx10 ノックアウトマウスの作製

Tbx10 遺伝子は 8 つのエキソンからなる遺伝子で、第 2 エキソン後半から第 8 エキシソンの 5'側までを nlsLacZ DNA で置換するようにデザインした。5'側から、TK 遺伝子、5'アーム(5.0 kbp)、nlsLacZ, polyA 付加シグナル、PGK-Neo、3'アーム(3.3 kbp)、DTA 遺伝子の順に連結し、ターゲティングベクターを完成させた。制限酵素で直線化した DNA を ES 細胞に電気穿孔法で遺伝子導入し、G418 + Gancyclovir 存在下で増殖してくるコロニーをサザンブロット法で確認し、相同的組み換えを起こした ES 細胞を得た。

#### 2. X-gal 染色

胎生期 9.5 日から 12.5 日の胎児を 0.2%グルタルアルデヒドで固定する。洗浄後、0.1% X-gal を含む専用溶液中で 37°C で一晩発色させた。

#### 3. 免疫組織化学

胎児はメタノール/DMSO (4:1)で一晩 4°C で固定した。内因性の peroxidase を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で不活化した。適度に希釈した 1 次抗体と反応させ、次に HRP 標識 2 次抗体を反応させた。洗浄後、DAB (diaminobenzidine)で発色させた。

### [結果]

#### 1. Tbx10 ノックアウトマウスの作製

ターゲティングベクターでは、LacZ 遺伝子を in frame に連結した。相同的組み換えを起こした ES 細胞は多数得られたが、そのうちキメラマウスの作製には 2 つの ES 細胞クローンを用いた。2 系統のキメラマウスともヘテロマウスが得られた。Flpe 発現マウスと交配し、ゲノム中の PGK-Neo 遺伝子を除去了(Tbx10<sup>LacZ/+</sup>)。このマウスの雌雄を交配し Tbx10 ホモマウスを作製した(Tbx10<sup>LacZ/LacZ</sup>)。ホモマウスはメンデル則に近い出現頻度を示した。

#### 2. Tbx10 遺伝子の発現は後脳に限局していた

Tbx10<sup>LacZ/+</sup>マウスを用いて、Tbx10 遺伝子の発現している細胞を観察した。胎生 9.75 日に、背側 rhombomere (菱脳にある分節構造) 4 と 6 に発現が認められた。その後、菱脳分節 4 では Tbx10 発現細胞は腹側後脳に移動した。菱脳分節 6 では Tbx10 発現細胞は移動せず、胎生 11.5 日までに発現が消失した。新生仔や成獣では、Tbx10 発現細胞は caudal pons に位置していた。Tbx10<sup>LacZ/LacZ</sup> マウスでの Tbx10 発現細胞の出現や移動は、Tbx10<sup>LacZ/+</sup> マウスと同じであった。

### 3. Tbx10 ホモマウスの異常は少数であった

Tbx10 ホモマウスには、内臓出血、体壁異常、下顎無形成を含む異常が見出された。生後にも原因不明の死亡も観察されたが、これらの異常は生後 9 日以内に起こった。Tbx10 ホモマウスの 8.9% (169 匹中 15 匹) にこれらの異常が観察されたが、その他のほとんどのホモマウスは正常に生まれ、生殖可能であった (169 匹中 154 匹、91.1%)。

### 4. Tbx10 発現細胞の特定

Tbx10 発現細胞を、細胞群の位置及び神経マーカーによる染色により特定を試みた。少なくとも、Tbx10 発現細胞は運動神経マーカーである Islet1 は陰性であった。

## [考察]

Tbx10 ホモマウスの異常はごく少数にしか観察されなかった。遺伝的背景を C57BL/6 から ICR や Balb/c に代えると、異常マウスの頻度が増すかもしれない。今回、Tbx10 遺伝子の役割についてホモマウスの症状観察からは明らかにできなかった。最近、抗体によるクロマチン免疫沈降法による標的遺伝子の同定が行われている。Tbx10 遺伝子の機能を明らかにするには、抗 Tbx10 抗体を用いたクロマチン免疫沈降による標的遺伝子の同定をする必要があると思われる。

## [結論]

1. Tbx10 遺伝子は、Tbx10 発現細胞の出現や移動に必要ではなかった。
2. Tbx10 遺伝子発現細胞は運動ニューロンではなく、介在ニューロンの可能性がある。
3. Tbx10<sup>LacZ/+</sup> マウスは Tbx10 遺伝子発現をモニターするマウスとして有用である。

## 論文審査の結果の要旨

転写因子 T-box 遺伝子ファミリーは発生において重要な役割を果たしており、ヒトにおいては TBX5 遺伝子の突然変異で上肢の異常と心臓奇形を合併する Holt-Oram 症候群が、TBX1 遺伝子の突然変異または欠失で、心臓大動脈異常、副甲状腺異常、胸腺異常、口蓋裂、特異的顔貌を示す DiGeorge 症候群が起こる。その他にもいくつかのヒト遺伝病の原因遺伝子となっていることが知られている。

そこで申請者は、新規 T-box 遺伝子を単離するため、Tbx1 の T-box ドメインをプローブとしてマウスゲノムライブラリーをスクリーニングした。その結果、Tbx10 遺伝子を得た。Tbx10 を異所性に発現したトランスジェニックマウスが口蓋裂を呈することは報告されていたが、当該遺伝子の欠失については自然発生を含めても報告がなく、その役割については未解明であったため、ノックアウトマウスを作製し表現型の変化について詳細に解析した。

ターゲティングベクターは Tbx10 遺伝子の第 2 エキソン後半から第 8 エキシソンの 5' 側までを nlsLacZ DNA で置換し、5' 側から、TK 遺伝子、5' アーム (5.0 kbp)、nlsLacZ、polyA 付加シグナル、PGK-Neo、3' アーム

(3.3 kbp)、DTA遺伝子の順に連結した。制限酵素で直線化したDNAをES細胞に電気穿孔法で遺伝子導入し、G418 + gancyclovir 存在下で増殖するコロニーをサザンブロット法で確認し、相同的組換えをおこしたES細胞を得た。キメラマウスの作製には2つのES細胞クローンを用いた。2系統のキメラマウスともヘテロマウスが得られた。Flpe発現マウスと交配し、ゲノム中のPGK-Neo遺伝子を除去した(Tbx10<sup>LacZ/+</sup>)。このマウスの雌雄を交配しTbx10ホモマウスを作製した(Tbx10<sup>LacZ/LacZ</sup>)。ホモマウスはメンデル則に近い出現頻度を示した。

胎生9.5日から12.5日の胎仔を0.2%グルタルアルデヒドで固定し、0.1% X-galを含む専用溶液中で発色させ、LacZ発現細胞を同定した。免疫組織化学法では胎仔をメタノール/DMSO (4:1)で固定し、内因性のperoxidase をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で不活化したのち、適度に希釈した1次抗体と反応させ、次いでHRP標識2次抗体を反応させ、DAB (diaminobenzidine)で発色させた。Tbx10<sup>LacZ/+</sup>マウスを用いて、Tbx10遺伝子発現細胞を観察した。胎生9.75日に、背側 rhombomere (菱脳にある分節構造)4と6に発現が認められた。その後、菱脳分節4ではTbx10発現細胞は腹側後脳に移動した。菱脳分節6ではTbx10発現細胞は移動せず、胎生11.5日までに発現が消失した。新生仔や成獣では、Tbx10発現細胞は橋尾側部に位置していた。Tbx10<sup>LacZ/LacZ</sup>マウスでのTbx10発現細胞の出現や移動は、Tbx10<sup>LacZ/+</sup>マウスと同様であった。さらに細胞群の位置および細胞マーカーによるTbx10発現細胞の特定を試みたが、運動神経マーカーであるIslet1は陰性で介在ニューロンの可能性が示唆された。

Tbx10欠損マウスには、内臓出血、体壁異常、下顎無形成を含む異常が見出され、これらの異常は生後9日以内に起こった。しかし、これらの異常はホモマウスでも約9%にしか観察されず、他は正常に生まれ生殖も可能であった。Tbx10発現細胞の発生や移動にも異常が見られなかったことから、Tbx10遺伝子の欠損に対しては強力な補償機構が働くことが示唆された。

審査委員会では、申請者がこれまでTbx10遺伝子の欠失についての知見が全く無くその役割についての検討がなされていない点に着目し、ノックアウトマウスを初めて作製した点、およびヒト遺伝病との関連が想定される本遺伝子変異体のヘテロ接合体の表現型の解析を可能ならしめ、今後Tbx10の標的遺伝子の同定等を経てTbx10遺伝子の機能を解明する道筋をつけた点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) Tbx10 ノックアウトホモマウスに異常が少ないが胎生致死の可能性は
- 2) 各種マーカーの免疫染色において X-gal との共染色は試みたか
- 3) Tbx10 遺伝子の発現パターンの検討を野生型で行ったか
- 4) 正常に生まれた Tbx10 ノックアウトホモやヘテロマウスはどれくらい生存したか
- 5) Tbx10 遺伝子が発現細胞の発生や移動に重要でないとは言えないのでは
- 6) ノックアウトマウスの異常発生が散発的なのは遺伝背景が関係しているか
- 7) T-box 遺伝子ファミリーは何種くらいあるか
- 8) Tbx10 遺伝子の置換に GFP ではなく LacZ を用いた理由は
- 9) 各種マーカーや Tbx10 遺伝子の発現細胞の検討を皮膚でも行ったか
- 10) Tbx10 遺伝子発現細胞がセロトニンあるいは GABA 含有細胞である可能性は
- 11) 唾液分泌にかかわる顔面神経運動ニューロンも Islet1 陽性なのか

- 12) ターゲティングベクターに用いたプラスミドのサイズは
- 13) DTA 遺伝子を取り扱う場合に必要な拡散防止レベルは
- 14) metazoan とはどのレベルの生物を意味しているのか
- 15) このノックアウトマウスを今後どう利用あるいは改良するつもりか
- 16) Tbx10 ノックイン遺伝子を現在の遺伝背景から他の近交系の遺伝背景に換えたコンジェニック系統において予想される表現型は
- 17) ヘテロマウスで見られた皮膚の異常部位における病理組織は

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 福田 敦夫

副査 蓑島 伸生

加藤 秀樹